中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 45(4): 370~381 (1996)

以逢機增殖多型性 DNA 分子標誌鑑別番椒屬野生馴化種原[1]

王昭月[2] 范明仁[2] 羅舜芳[2] 劉新裕[3]

摘要：本試驗以源自日本、美國、巴西和匈牙利等地區之番椒屬14個品系，探討利用逢機增殖多型性 DNA (RAPD) 建立種間之分子標誌，以鑑別番椒屬重要野生馴化種之種原。試驗結果顯示，以 UBC327, UBC346, UBC441及 UBC457等四個隨意引子，經聚合酵素連鎖反應 (PCR)，其 RAPD 之產物具有明顯的多型性表現，且在增殖之多型性 DNA 片段中，可獲得11個有效之多型性 DNA 片段，提供作爲不同「種」辨識之標誌。其中 UBC 327, UBC 346及UBC 457三個引子產生的多型性 DNA 片段，更具有指紋比對之功效，可以清楚地將14個不同品系加以區別。利用上述四個引子產生之所有多型性 DNA 片段，一併進行相似性群集分析 (UPGMA cluster analysis) 之結果顯示，供試的14個品系可分成四個群，第一群包含 2 個品系，屬於 *C. chinense*；第二群包含 4 個品系，屬於 *C. annuum*；第三群包含 5 個品系，也屬於 *C. annuum*；第四群則包含 3 個品系，屬於*C. baccatum*。試驗結果證實，RAPD 標誌對番椒屬具有指紋比對之效，可作爲一種有效且值得信賴之種原鑑別工具。

關鍵詞：逢機增殖多型性 DNA、群集分析、DNA 指紋比對、番椒。

植物遺傳資源保育及有效利用，關係著未來農業生產改進，而種原保育與利用的關鍵，除了識別特殊遺傳特性或評估種原歧異度外，如何開發快速且正確的遺傳特性標誌技術，也是亟須配合發展的要件之一[6]自1984年 Kary Mullis 提出聚合酵素連鎖反應技術 (polymerase chain reaction, PCR)，近十年來已非常廣泛的應用於分子生物研究上，如：(1)探針製備 (probe preparation)，(2)選殖系篩檢 (clone screening)，(3)基因圖譜比對 (mapping)，(4)製備定序用模板 (sequencing template)。唯此利用範圍多針對某特定基因之研究[3]。1990年Williams[15]及 Welsh 等人 (1991)[13]則相繼開始以隨意引子 (arbitrary primer) 進行聚合酵素連鎖反應，使用的引子亦稱爲逢機引子 (random primer)，其多爲10~20個核甘酸序列，之後特將此反應稱爲隨意引子聚合酵素連鎖反應 (arbitrary primer polymerase chain reaction, AP-PCR)，而經此擴增的多型性 DNA 片段則稱爲逢機增殖多型性 DNA 標誌 (random amplified polymorphic DNA marker, RAPD marker)。RAPD 分析方法可應用於遺傳分析標誌、種質鑑定[6,14,16]，或 DNA 指紋比對[11,13]，是一種簡單便利的基因研究工具。

番椒 (pepper, paprika) 是茄科 (Solanaceae) 番椒屬 (*Capsicum*) 一或多年生蔬菜，原產於中、南美洲，如墨西哥、秘魯及瓜地馬拉一帶，據 FAO 1993年調查，全世界有1,224,000公頃的栽

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第 1871 號。
2. 本所作物種原室助理研究員、研究員及約僱技術員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。
3. 本所農藝系研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

培面積，其中亞洲地區就占56.5%，因此也是亞洲重要經濟蔬菜之一。番椒果實依辣味有無可分爲二類：有辣味類（pungent），俗稱爲辣椒（hot pepper, chile pepper, chili pepper）；無辣味類（nonopungent）俗稱甜椒（bell pepper, sweet pepper）。

番椒屬內花色、果型分歧很大，故早期「種」的分類很紊亂。曾以花色分成二大群：紫花、白花群；也有依果型特徵分類的[10]，但多屬於較粗放之形態分類，無法正確地臆測「種」間的演化及血緣關係。至目前較廣爲接受的番椒分類，可歸納爲20～30個野生種及 5 個馴化栽培種，此係 Mc Lood 等人（1983）依據植物形態及酵素電泳分析（isozyme electrophoresis）參考歸納的結果[7]，其中五個馴化栽培種爲：*C. annuum*（包含全部甜椒品種及大部分辣椒商業品種）；*C. chinense* Jacqin（辣椒），*C. frutescens* L.，*C. baccatum* L.，及 *C. pubeseens* Ruiz & Pavon。此五個馴化種皆爲人類重要經濟栽培種，前三種更幾乎囊括了全球性主要的番椒栽培品種。五個馴化種中除了*C. pubescens* 有黑色種子，*C. baccatum* 花冠基部有散漫黃斑，較易辨認外；其餘 *C. annuum*、*C. chinense* 及 *C. frutenscens* 三者則不容易自植株上花器或果實特性加以分類，必須以染色體鏡檢，或進行雜交親合力鑑定等方式，才能淸楚的鑑別不同馴化種。

爲深入探討番椒演化過程中種間遺傳相似性（similarity），評估地域性種原演化歧異度，或鑑別新野生種原之血緣，近五年來國際間多位學者已著手研究應用鑑別能力較敏銳且快速的分子生物標誌，作爲番椒種原遺傳分析。如 Conicella（1989）以酯酵素（esterase）之同功異構酵素，探討不同地域來源之番椒（*Capsicum annuum* L.）種原[2]，結果以 esterase 酵素圖譜分爲 A、B、C 三型，種原來自美國南部者依不同區可分屬 A、B 二型；墨西哥地全屬 A 型；中美洲全屬 B 型；南美洲的秘魯 B 型；哥倫比亞 C 型，此結果可用以評估種原蒐集地點的歧異度，提供育種人員之參考。Inai 等人（1993）利用 RAPD marker，進行甜椒 *C. annuum* 與辣椒*C. chinense* 種間雜交之後裔中矮化遺傳基因的篩檢[5]。Prince 等人（1995）利用RAPD 分析21個源自不同地區之不同種的番椒品系，結果除發現 PCR 反應產生的多型性 DNA 片段，可淸楚的作爲品種間 DNA 指紋比對（DNA fingerprinting）外，這些 PCR 增殖的 DNA 多型性片段，經 UPGMA 的群集分析（cluster analysis），可淸楚的將21品系分成四群，其中 *C. annuum* 與 *C. frutescens*遺傳相似性最高，但與 *C. baccatum* 的遺傳相似性較小[11]。

本省位於番椒主產區的亞洲地帶，故亞洲蔬菜研究發展中心（Asian Vegetable Research & Development Center, AVRDC）多年來針對此一重要蔬菜，積極自世界各地進行種原蒐集與保存，目前該中心內番椒種原已達4,000品系以上。而本省爲因應種原保育與利用對未來國際間農業上之重要性，特於1993年在臺灣省農業試驗所內成立國家作物種原中心，負責本省之作物種原之蒐集與保存，對番椒此一重要蔬菜作物已逐年備份保存至種原庫內，目前入庫之番椒種原已達1,000品系以上。本研究目的即自其中取得部分代表性種原，期以快速有效的 RAPD 分析方式，建立不同「種」之分類標誌。藉由分子標誌之建立，配合遺傳相似性群集分析，達到更詳實之種原鑑別與管理。俾對於新蒐集或引進種原親緣鑑別與地域性種原歧異度的評估有所助益，提高遺傳資源應用之正確性。

材料與方法

一、植物材料

取自亞洲蔬菜研究發展中心蒐集番椒屬（*Capsicum*）14個品系，源自日本、美國、巴西和匈牙利等地區（Table 1），包含 *C. annuum*，*C. baccatum* 及 *C. chinense*，等三個經濟栽培之馴化種。其中除 *C. annuum* 內的 C01125、C01238、C01127 爲甜椒外，其餘均爲辣椒。供試14品系的番椒種子於1995年 9 月播種，一個月育苗後定植於 9 吋素燒盆，種植於玻璃溫室內。栽培介質係以 Bio-Mix TTING SOIL 2 混合粗發泡煉石（3：1）種植，至1996年一月至二月之結果期，參考

AVRDC番椒性狀調查，記錄未熟果色、成熟果色、果長、果實、果重及果形等果實性狀。

表 1. 進行種間多型性研究之番椒種原代號與基本資料
Table 1. Accessions of pepper (*Capsicum* spp.) used in the interspecific polymorphism study.

Order number	P.I. no.	Species	Country of origin	Cultivar
1	HC0001	*C. annuum*	USA	Hungarina yellow
2	HC0002	*C. annuum*	USA	Jaiapene
3	C01454	*C. annuum*	Japan	Goshiki
4	C01665	*C. annuum*	Zambia	
5	C04701	*C. chinense*	Brazil	
6	C04073	*C. baccatum*	Brazil	
7	C02090	*C. annuum*	Hungary	Cseresznyepaprika
8	C04676	*C. chinense*	Brazil	
9	C04191	*C. baccatum*	Brazil	Pimenta
10	C04164A	*C. baccatum*	Brazil	Pimenta
11	C00196-1	*C. annuum*	USA	
12	C01125	*C. annuum*	USA	Yelllow Oshkosh
13	C01238	*C. annuum*	Switzerland	Piment de Genesa corer de boaf
14	C01127	*C. annuum*	Romania	Arolei Lung

二、DNA 萃取

取植株嫩葉0.15公克放入1.5ml已滅菌的小離心管，加入液態氮磨碎，後加入500μl的 DNA 萃取緩衝液 (100mM Tris-HCl，pH8.0；20mM EDTA；1.4mM NaCl；0.2%(v/v)β-mercaptoethanol)，再放入65°C水浴30分鐘，輕輕混勻後加入500μl chloroform-isoamyl alcohol (24：1，v/v) 再輕輕混勻。，以20°C，16,000g離10分鐘 (SIGMA 2K15，rotor 12145)。再取上清液加入300 μl之冰冷 isopropanol，混合均勻後放置在室溫下沉澱1～2小時 (或－20°C，隔夜)。再於4°C，16,000g離心10分鐘。小心倒掉上清液，再加入1ml的 washing buffer (76% ethanol (v/v)；10 mM ammonium acetate) 輕輕混勻後，再於4°C下以16,000g離心10分鐘。再倒掉上清液，將沉澱的 DNA置於無菌操作臺風乾。風乾的 DNA 溶於50μl的無菌水再加入 RNase (10μg/ml) 在37°C下反應20分鐘。最後取10μl的 DNA 溶液，稀釋100倍並測定 OD260nm 之讀值，及計算DNA 含量濃度。

三、聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 與電泳

將萃取得之 genomic DNA 先稀釋成5ng/μl放置在－20°C下，提供聚合酵素連鎖反應時，作爲模板 DNA (template DNA)。另外利用10個核甘酸序列的隨意引子300種 (UBC RAPD primer set：100/4及100/5 200種；Operon KitA：AO、AP、AQ、AR、AS 100種)，並由先前 PCR 反應產物中篩選出多型性 DNA 片段明顯的引子 6 個：UBC313，UBC327，UBC346，UBC441，UBC457，UBC484 (王，1995) 進行聚合酵素連鎖反應。反應時採用0.5ml已滅菌的小離心管進行，反應液參考 Oard 及 Dronavalli (1992)，反應總體積爲25μl，內含1 u *Taq* ploymerase (Promega)、1×PCR buffer (50mMKCl；10mM Tris-HCl，pH9.0；0.1% Triton 100)、2.5 mM $MgCl_2$、200μM dNTP、20μM primer 及 25ng template DNA。聚合酵素連鎖反應儀器爲 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler480，反應溫度條件參考 Oard 及 Dronavalli (1992)，設定

如下：1次（cycle）：94°C，3分鐘→37°C，1分鐘→72°C，1分鐘；44次（cycles）：94°C，1分鐘→37°C，1分鐘→72°C，2分鐘。反應完成時自動保存在4°C。

經聚合酵素連鎖反應而增殖之 DNA，取12μl加入稀釋6倍的電泳緩衝液（6×loading buffer：0.25% bromophenol blue 及 xylene cyanol，40% w/v sucrose），以2%的 agarose 在 TAE buffer（40 mM Tris acetate，pH 8.0；1mM EDTA）中進行 DNA 電泳。電泳槽係採用 Cosmo 生產的 Mupid-2，電壓設定100伏特，電泳時間約25分鐘，結束後置於0.5mg/ml 的ethidium bromide 中染色20～30分鐘，再置於 UV 光箱中，檢視 agarose 膠體上DNA 多型性片段，並照相及貯存影像於 IS 500 Digital Imaging System（Alpha Innotech Corporation）進行分析。

四、資料分析

群集分析是採用 Gel-Compar 軟體，計算兩品系間所有分析的 RAPD 條帶中相同條帶的比率。所有樣品兩兩分析後以 UPGMA（Unweighted Pair-Grouping Method Using Arithmetic Averages）估算相似性程度。RAPD 產物的 DNA 片段係以ϕ174/HaeIII 作為估算分子量。並以 Dice's 相似性係數製矩陣表格，相似性係數值的計算方式為 $F=2nxy/nx+ny$。nx 及 ny 分別代表 X 及 Y 品系的所有多型性 DNA 片段，nxy 則表示 X 及 Y 品系間都共有的片段數（simple matching coefficient, Nei & Li 1979），再於 Digital 個人電腦中以 Gel-Compar 軟體進行 UPGMA 群體分析，估算品系間遺傳相似程度。

結　　果

一、果實性狀

來自不同地區的番椒屬內之不同馴化種（表1），其果實性狀（果形及果色等）明顯不同（圖1，表2），於結果期可依自果形區別不同種原。一般而言，甜椒品系的果型要較大於辣椒品系，相對果重也較大。參試品系中C01127、C01125及C01238三甜椒品系之果形明顯較大（表2）。供試14品系之未熟果色為黃或綠色，成熟果色則有黃、橙紅、紅色；果形有尖長型、圓錐形、卵圓形、鐘形等。由不同果色與不同果形可初步瞭解番椒種原的歧異性之表現。

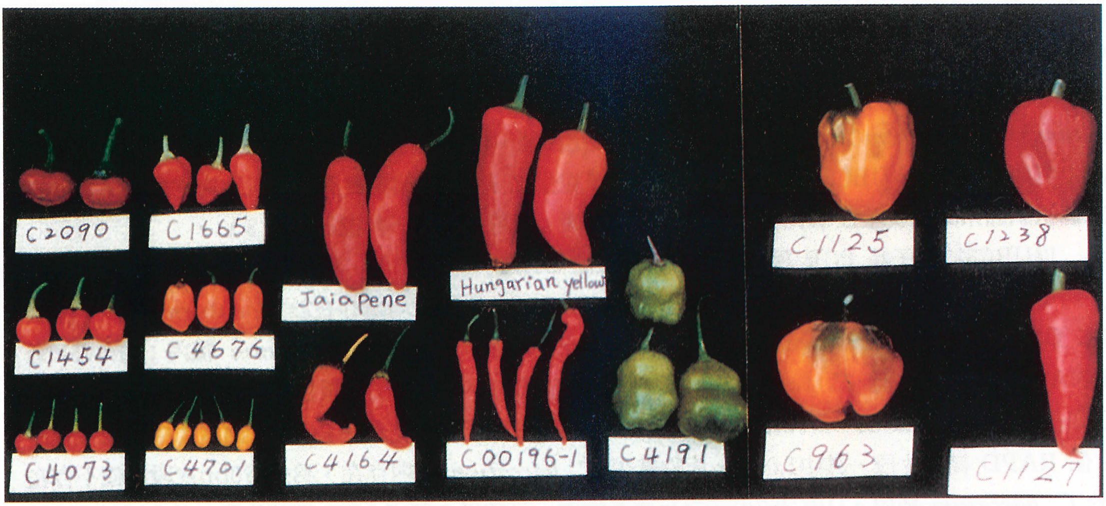

圖 1.　不同番椒馴化種之果實型態

Fig. 1. Fruit shapes of comesticated species of *Capsicum*.

表 2. 14個供試番椒種原之果實特性

Table 2. Fruit characterizations obatined from 14 accessions of pepper

P.I.no	Fruit color		Fruit size			Fruit shape
	Immature	Mature	Length (cm)	Width (cm)	Weight (g)	
HC0001	green	red	8.5	3.4	26.0	elongate
HC0002	green	red	7.2	1.8	13.1	elongate
C01454	yellow	orange-red	1.6	1.6	2.1	conical
C01665	yellow	red	2.6	1.8	2.7	conical
C04701	yellow	yellow	1.3	0.7	0.4	conical
C04073	green	red	1.1	1.0	0.64	round
C02090	green	red	2.4	2.8	9.0	oblate
C04676	green	orange	2.6	1.3	2.8	oval
C04191	green	red	4.0	3.1	14.0	campanulate
C04164A	green	red	5.1	1.6	4.0	elongate
C00196-1	green	red	4.9	0.7	1.0	elongate
C01125	green	yellow	7.5	5.2	52.1	bell
C01238	green	red	6.5	4.7	42.0	conical
C01127	green	red	10.1	3.1	31.0	conical

二、逢機增殖多型性 DNA 標誌

逢機引子300種（UBC RAPD primer set：100/4及100/5共200種；Operon Kit A：AO、AP、AQ、AR、AS共100種）經由先前 PCR 反應產物中所進行 RAPD 分析結果，篩選出多型性 DNA 片段表現明顯的引子 6 個：UBC313，UBC327，UBC346，UBC441，UBC457，UBC484[1]，以此 6 個篩選得到的引子，進行番椒屬新引進14個不同馴化種之 RAPD 分析。結果以UBC327（圖 2）、UBC346（圖 3）、UBC441（圖 4）及UBC457（圖 5）四個引子進行之 PCR 反應，在 *C. annuum*，*C. baccatum* 及 *C. chinenese* 三個馴化種間，均可產生清晰且具辨識效用之多型 DNA 片段；其中UBC327、UBC346及UBC457三個引子產生之 RAPD 圖譜更具有指紋比對之效果。由於在14個供試品系間之多型性 DNA 圖譜表現均不相同，可用於鑑別不同種原（表 3）。

以UBC327引子經 PCR 反應，所產生多型性 DNA 片段產物中，獲得 5 個可用於識別不同「種」的 DNA 片段（圖 2，表 4），其中2,749bp及1,348bp二片段均僅存在於 *C. chinense* 種內；942 bp DNA 片段僅在 *C. baccatum*種內存在；420bp片段只存在於 *C. annuum* 種內；另外652bp DNA 片段則不存在於 *C. baccatum* 種內。由 UBC346中獲得 2 個多型性 DNA 片段：1,353bp及260bp，可用於標誌 *C. baccatum*（圖 3，表 4）。由UBC441引子經 PCR 反應產物中，也可獲得 2 個 RAPD 標誌片段，其中1,069bp片段僅在 *C. baccatum* 種內存在，另外370bp片段則僅不存在於 *C. baccatum* 種內。UBC457引子之反應產物中，可獲得 2 個 RAPD 標誌片段，其中833bp片段不存在於*C. chinense* 種內，618bp片段則僅不存在於 *C. baccatum* 種內（圖 5，表 4）。

表 3. 以 RAPD 爲番椒馴化種鑑別之引子

Table 3. Rrimers used for RAPD analysis and discrimination of *Capsicum* domesticated species

Primer	Sequence
UBC327	5′ATACGGCGTC3′[z]
UBC346	5′TAGGCGAACG3′[z]
UBC441	5′CTGCGTTCTT3′
UBC457	5′CGACGCCCTG3′[z]

[z] Possessed fingerprinting effect.

表 4. 以 RAPD 特定分子片段之存在(+)或不存在(−)標誌番椒屬之不同種

Table 4. Presence(+)or abscence(−)of RAPD markers in genus of *Capsicum*.

Primer	Polymorphic DNA marker	*C. annuum*	*C. baccatum*	*C. chinense*
UBC327	2749bp			+
	1348bp			+
	942bp		+	
	625bp		−	
	420bp	+		
UBC346	1353bp		+	
	260bp		+	
UBC441	1061bp		+	
	370bp		−	
UBC457	833bp			−
	618bp		−	

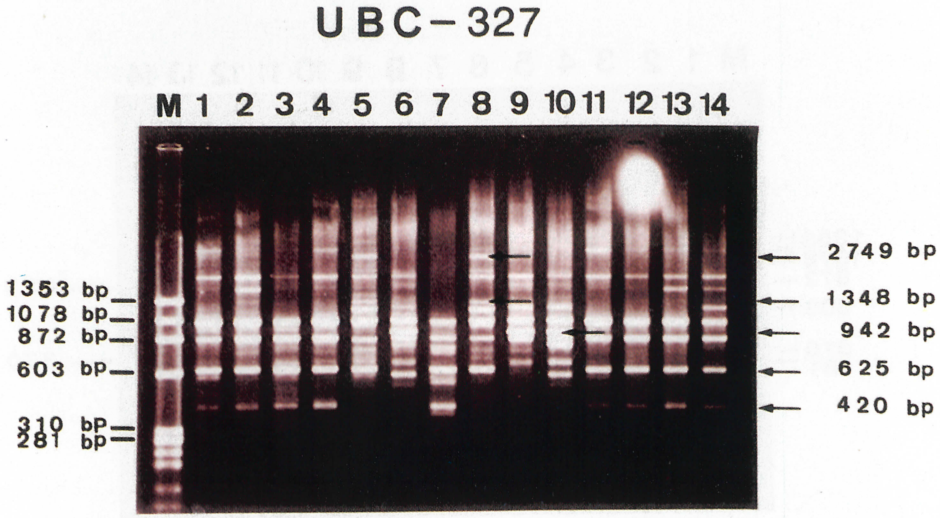

圖 2. 番椒屬14品系（如表１），以UBC327爲引子之 RAPD 圖譜

Fig. 2. RAPD profiles generated by primer UBC-327, resolved by 2.0% agarose gel. Numbers on top refer to the accessions listed in Table 1.

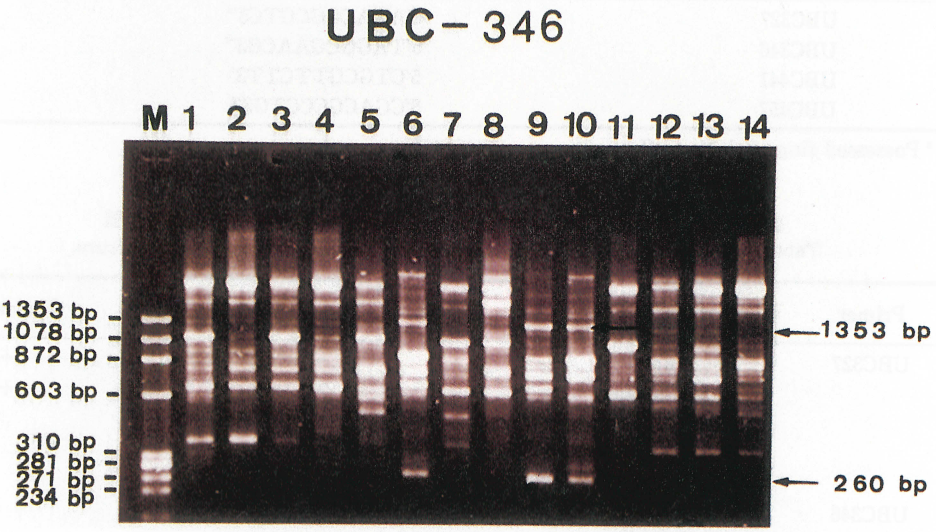

圖 3. 番椒屬14品系（如表 1），以UBC346爲引子之 RAPD 圖譜

Fig. 3. RAPD profiles generated by primer UBC-346, resolved by 2.0% agarose gel. Numbers on top refer to the accessions listed in Table1.

圖 4. 番椒屬14品系（如表 1），以UBC441爲引子之 RAPD 圖譜

Fig. 4. RAPD profiles generated by primer UBC-441, resolved by 2.0% agarose gel. Numbers on top refer to the accessions listed in Table1.

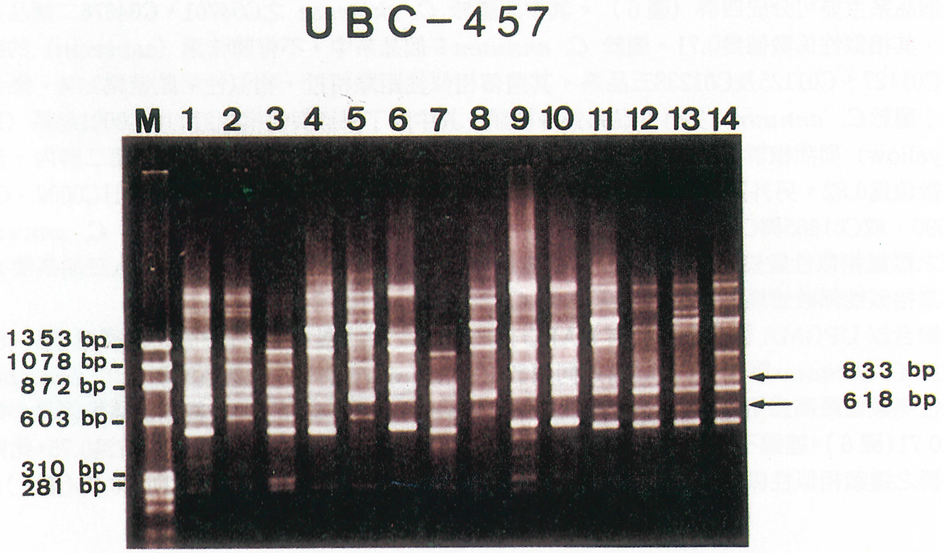

圖 5. 番椒屬14品系（如表１），以UBC457爲引子之 RAPD 圖譜
Fig. 5. RAPD profiles generated by primer UBC-457, resolved by 2.0% agarose gel. Numbers on top refer to the accessions listed in Table1.

將UBC327、UBC346、UBC441及UBC457四個引子，經 PCR 反應之所有 RAPD 多型性片段以 Dice's 相似性係數進行 UPGMA 群集分析。計算相似性係數(Dice's similarity coefficient)構築相似性矩陣(simliarity matrix)之結果顯示，供試的14個番椒品系之相似性係數值自0.5至1.0(表５)。相似性係數值最低的0.5，存在於C04701(*C. chinense*)與C04164A(*C. baccatum*)二品系間；相似性係數值最高之1.0，存在於C01454(*C. annuum*)與HC0002(*C. annuum*)二品系間(表５)。

表 5. 番椒14品系之 RAPD 圖譜，以 Dice's 計算之相似性矩陣
Table 5. Similarity matrix for Dice's coefficient among 14 pepper accessions

Accession no.	symbol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
C04701	1	1.00													
C04676	2	0.71	1.00												
C01127	3	0.71	0.71	1.00											
C01125	4	0.63	0.63	0.82	1.00										
C01238	5	0.67	0.67	0.87	0.96	1.00									
HC0001	6	0.71	0.59	0.80	0.82	0.86	1.00								
C01665	7	0.71	0.71	0.59	0.74	0.78	0.71	1.00							
C00196-1	8	0.77	0.77	0.75	0.67	0.71	0.75	0.92	1.00						
HC0002	9	.071	0.71	0.71	0.74	0.78	0.85	0.86	0.92	1.00					
C01454	10	0.71	0.71	0.82	0.74	0.78	0.82	0.86	0.92	1.00	1.00				
C02090	11	0.80	0.67	0.89	0.70	.0.74	0.78	0.80	0.86	0.93	0.93	1.00			
C04073	12	0.53	0.67	0.67	0.70	0.63	0.56	0.87	0.71	0.53	0.53	0.63	1.00		
C04191	13	0.63	0.63	0.74	0.76	0.80	0.74	0.75	0.80	0.63	0.63	0.71	0.82	1.00	
C04164A	14	0.50	0.75	0.53	0.67	0.60	0.63	0.75	0.67	0.63	0.63	0.59	0.82	0.78	1.00[z]

[z] Range of value from 0 to 1.00, values closer to 1.00 indicating increasing similarity.

由 similarity matrix 繪製14個品系間 UPGMA 分析之群集樹狀圖（dendrogram）的結果顯示，14個品系主要可分成四群（圖 6）。其中原屬於 *C. chinense* 之C04701、C04676二個品系分在第一群，其相似性係數值爲0.71。屬於 *C. annuum* 9 個品系中，不帶辣味素（capsacin）的甜椒類，包含C01127、C01125及C01238三品系，其遺傳相似性距離相近，相似性係數值爲0.84，集合在第二群內；屬於*C. annuum* 另外 6 品系爲辣椒類，其中除了果形與甜椒相近的HC0001品系（Hungarian yellow）與甜椒群（C01127、C01125及C01238）遺傳距離較近，同集合在第二群內，群集相似性系數值爲0.82。另外同屬於 *C. annuum* 之辣椒類 5 品系集合成第三群，其中HC0002、C01454及C02090，或C01665與C00196-1相似性係值較高，分別爲0.93及0.92，總合第三群 *C. annuum* 的辣椒類之群集相似性數值爲0.75。最後第四群爲其餘的C04073、C04191、C04164A三品系集合成一群，群集相似性係數值爲0.8，此三品系均爲 *C. baccatum*（圖 6）

綜合以 UPGMA 群集分析所有 RAPD 產物獲得之樹狀圖，結果可分成的四群中，第一群之品系同屬於 *C. chenese*，第二、三群之品系同屬於 *C. annuum*，第四群之品系同屬於 *C. baccatum*。群內相似性係數值最高爲第三群之0.87，其次爲第二群的0.82及第四群的0.80，相似性係數值最小的是第一群之0.71（圖 6）。連鎖不同群間遺傳距離最近的是第二及第三群，其相似性係數值爲0.75，此兩群再與第一群之連鎖相似性係數爲0.70，上述一、二、三群與第四群之連鎖相似性係數則爲0.65（圖 6）。

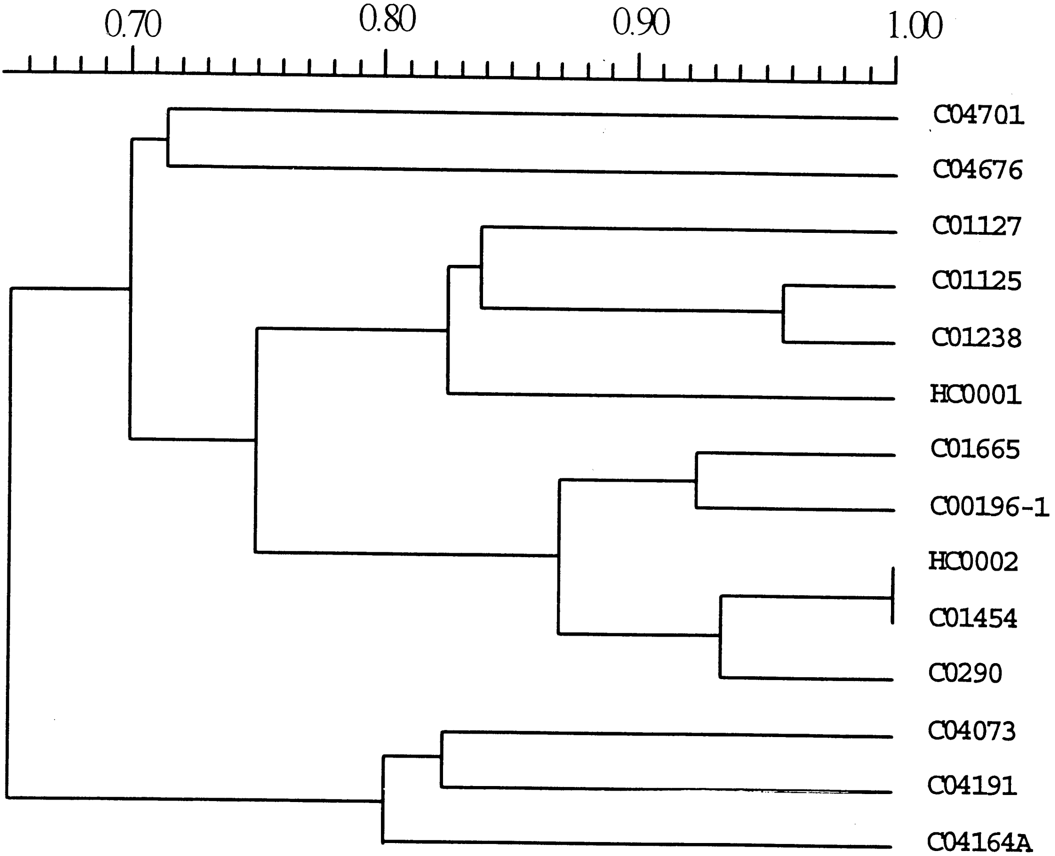

圖 6. 番椒14品系之 RAPD 圖譜，經 Dice's 計算之相似性矩陣所構築之相似性樹狀圖

Fig. 6. Dendrogram of 14 pepper accessions, constructed by UPGMA based on Dice's similarity coefficients. The scale on the top is Dice's coefficient of similarity.

討　論

早期最傳統的植物分類方式，不外乎利用一些植物外表型態或性狀（如花器、果實等）進行分類或「種」的鑑別，這種分類方式在番椒作物上也不例外。Pickergill 等人（1969）以花器及果實特性等植物性狀，可分辨番椒屬（*Capsicum*）中的五個馴化種：*C. baccatum*、*C. pubescens*、*C. annuum*、*C. chinense* 及 *C. frutsecesns*，但後三個「種」間植物性狀相似性較高，有時並不容易完全區分。McLeed 等人（1983）進一步利用同功異構酵素分析番椒種原，使番椒種間之分類除植物性狀外，進入分子生物鑑別的層次。以酵素電泳分析除了證實番椒可分爲五個馴化種外，由其酵素圖譜（zymogram）表現，另可證實 *C. annuum*、*C. chinense*及 *C. frutescens* 三個種具有很高的相似性。其後，Prince 等人（1995）利用RAPD 分析不同來源地區之番椒種原，發現 *C. annuum*，*C. frutescens* 及 *C. baccatum* 三個馴化種的各不同品系經群集分析結果，屬於同一馴化種的品系，可自然集合成一群，此對於「種」的分析具有高效的鑑別能力；此外對於同「種」內的不同品系以 RAPD 分析也能達到指紋比對的效用。另外，王（1995）同樣以 RAPD 分子標誌用於番椒品種鑑定時發現，RAPD分析可用於 *C. annuuum* 種內不同栽培或雜交種之鑑別，且利用這些 RAPD 分析之多型性DNA 片段，經 UPGMA 群集分析，也可正確的評估品系間遺傳親緣的相似性，並與植物性狀分類結果吻合。

本研究延續過去以 RAPD 分子標誌用於番椒品種鑑定所篩選得之引子，並擴展研究材料包含源自日本、美國、巴西和匈牙利等地區之*C. annuum*，*C. chinense* 及 *C.baccatum*三個馴化種間之品種爲材料，結果發現，這些品系經進行 RAPD 標誌及群集分析，也會將屬於同一馴化種的品系集合成一群。因此利用 RAPD 分析技術，可將演化上相似性高的馴化種歸成遺傳距離相近的一群（圖 6），對於「種」的演化或分類，應爲一種有效的證明或鑑定工具。

本試驗印證 RAPD 之分析，可以正確的提供種間或種內遺傳相似性，評估種原歧異度或不同品系間遺傳上血緣相似性；此外藉由 RAPD 分析所篩選得到具明顯多型性的特定引子，經 PCR 反應後，自產物中另可得到具有不同「種」間相異且特有的 DNA 片段之存在。如本研究中，引子UBC327經 PCR 反應，產物中2,749bp及1,348bp二個增殖的 DNA 片段都可以作爲鑑別 *C. chinense* 的特有條帶（圖 2，表 4）；942bp片段可以作爲鑑別 *C. baccatum* 的特有條帶（圖 2，表 4）；420bp片段則可作爲鑑別*C. annuum* 的特有條帶（圖 2，表 4），故以引子UBC327進行PCR 反應，即可篩檢出番椒屬內 *C. annuum*、*C. chinense* 或 *C. baccatum* 三個不同「種」之種原，此對於新蒐集引進及血緣不清楚之野生種原鑑定上，即可在幼苗階段萃取其genomic DNA 進行 RAPD 分析而得知應屬於何「種」，或評估與某些已知重要種原之血緣相關性，此除了具有快速且正確鑑別種原的目的外，對於提高種原保育與利用效率也具正面價值。

以 RAPD 進行種原分析時，另一個值得注意的問題是，作物的授粉行爲與基因同質性高低等遺傳特性。自花授粉（self-pollinationing）作物如茄科的番茄，其 DNA 多型性表現會較低，而異花授粉的作物如玉米，進行 RAPD 分析時則容易表現較高的多型性（Helentjaris, et. al, 1986）。另外遺傳基因同質性的高低也與 RAPD 分析樣品取樣數目之大小具關連性。同質性低的作物要取得一定數目的樣品（株），混合後萃取其 genomic DNA，才具有該種質（germplasm）的代表性。Yang 等人（1993）以芹菜爲例，建議最好混合5～20株的樣品，萃取其 genomic DNA，作爲 PCR 反應中的模板 DNA，才具有代表性。其餘不同作物則應視其基因同質性高低，考慮模板 DNA萃取時使用植株取樣之多寡，才能使該 genomic DNA 具代表性，隨之進行 PCR 反應，其 RAPD 分析之產物才能有更正確之判讀數值。本試驗材料番椒爲常異交作物，而目前係採 3 株之材料混合代表，未來將再就遺傳特性對 RAPD 分析之再現性，與取樣品數目之相關性，作進一步之探討。

引用文獻

1. 王昭月。1995。同功異構酵素與逢機增殖多型性 DNA 標誌在番椒品種鑑別之研究。國立中興大學碩士論文。
2. Conicella, C., A. Errico and F. Saccardo. 1989. Cytogenetic and isozyme studies of wild and cultivated *Capsicum annuum*. Genome 33:279-282.
3. D'Ovidio, R. 1993. Single-seed PCR of LMW glutenin genes to distinguish between durum wheat cultivars with good and poor technological properties. Plant Mol. Biology 22:1173-1176.
4. Helentjaris, T., M. W. S. Slocum, A. Schaeffer, J. Nienhuis. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphism. Theor. Appl. Genet.72: 761-769.
5. Inai, S., K. Ishikawa, O. Nunomura and H. Ikehashi. 1993. Genetic analysis of stunted growth by nuclear -cytoplasmic interspecific hybrids of *Capsicum* by using RAPD markers. Theor. Appl. Genet.87: 416-422.
6. Kresovich, S., J. G. K. Williams, J. R. McFerson, E. J. Routman, and B. A. Schall. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleraces* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. Theor. Appl. Genet. 85:190-196.
7. McLeod, M. J., S. I. Guttman and W. H. Eshbaugh. 1983. Pepers. pp.189-202 *In:* S. D. Tanksley and J. J. Orton (eds.) Isozymes in plant genetics and breeding. Part B. Elsvier, Amsterdam.
8. Nei, M. and W. H. Li. 1979. Methematical model for studying genetic variation in terms of restriction endoucleases. Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A. 76:5269-5273.
9. Oard, J. H. and S. Dronavalli. 1992. Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random-primer PCR. Plant Mol. Bio. Rep.10:236-241.
10. Pickersgill, B. 1969. The domestication of chili peppers. pp. 443-450. In: The domestication and exploitation of plants and animals. P. J. Ucko and G. W. Dimbleby (eds.) .Duckworth Press Ltd., London.
11. Prince, J. P., K. L. Vincent, A. Carmichael, R. B James, and M. K. Molly.1995. A survey of DNA polymorphism with the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. Genome. 38: 224-231.
12. Sun, S. S. M. 1994. A Laboratiory Training Manual Methods in Plant Molecular Biology and Agriculture Biotechnology. pp. 41-42. The Asian Vegatable Research and Development Center.
13. Welsh, J. and M. Mc-Clelland. 1991. Genomic fingerprinting using arbitrarily primer PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. Nucleic Acid Res. 19:5275-5279.
14. Wilkie, S. E., P. G Isaac and R. J. Slater. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium.*Theor. Appl. Genet. 86:497-504.
15. Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res. 18:6531-6535.
16. Yang, X. and C. Quiros. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 86:205-212.

Study on the Molecular Markers of *Capiscum* Wild/Domesticated Species Using Random Amplified Polymorphic DNA Analysis[1]

Jau-Yueh Wang[2], Ming-Jen Fan[2], Shuen-Fang Lo[2] and Sin-Yie Liu[3]

Summary

Fourteen pepper (*Capsicum* spp.) accessions, originated from Japan, USA, Brazil, and Hungary etc. were surveyed by random amplified ploymorphic DNA (RAPD) analysis. The results indicated that high degree of polymorphism was obtained from four random decamer primers (UBC327, UBC346, UBC441, and UBC457) which produced 11 reproducible and effective amplification fragments useful for identification between species. Besides, each of the tested accessions of *Capsicum* could be exactly distinguished from each other by using the primers of UBC327, UBC346, and UBC457. Results of smilarity analysis cluster analysis (UPGMA, Unweighted Pair-Grouping Mean Arithmetic Averages) revealed these accessions could be divided into four groups : the first contained 2 accesssions, belonging to *C. chinense*, the second was composed of 4 accessions, belonging to *C. annuum*, the third contained 5 accessions, also belonging to *C. annuum*, and the fourth had 3 accessions, belonging to *C. baccatum*. The results strongly suggested that RAPD markers possessed the effect of fingerprintig and could be effectively and reliably used for classification *Capsicum* spp..

Key words : Random amplified polymorphic DNA (RAPD) , Cluster analysis, DNA fingerprinting, Pepper (*Capsicum* spp.)

1. Contribution No. 1871 from Taiwan Agriculture Research Institute.
2. Respectively, Assistant Agronomist, Senior Agronomist, and Research Assistant, Crop Genetic Resources Laboratory, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Senior Agronomist, Department of Agronmy, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.